

(19) BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

(12) Offenlegungsschrift  
(10) DE 199 16 140 A 1

(6) Int. Cl. 7:  
**C 12 N 9/02**  
C 12 N 15/53  
C 12 N 15/63  
A 01 H 4/00  
C 07 K 14/415  
C 12 P 23/00

(71) Anmelder:  
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

(72) Erfinder:  
Linden, Hartmut, Dr., 78462 Konstanz, DE;  
Sandmann, Gerhard, Prof. Dr., 63065 Offenbach, DE

- Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingesetzten Unterlagen entnommen
- (54) Carotinhydroxylase und Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllderivaten
- (55) Die vorliegende Erfindung betrifft Proteine, die eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin aufweisen, Nukleinsäuren, die diese Proteine codieren, Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend diese Nukleinsäuren, genetisch veränderte Organismen, wobei die genetische Veränderung die Genexpression dieser Nukleinsäure verglichen mit einem Wildtyp verursacht oder erhöht, sowie Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllderivaten.

DE 199 16 140 A 1

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Proteine, die eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin aufweisen, Nukleinsäuren die diese Proteine codieren, Nukleinsäurestrukturen, enthaltend diese Nukleinsäuren, genetisch veränderte Organismen, wobei die genetische Veränderung die Genexpression dieser Nukleinsäure verglichen mit einem Wildtyp verursacht oder erhöht, sowie Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllderivaten.

Xanthophylle sind Sauerstoff-haltige Carotinoide tierischer, pflanzlicher oder mikrobieller Herkunft. Xanthophylle wie Lutein, Zeaxanthin oder Astaxanthin stellen als Pigmentierungsstoffe und Vorstufen von Vitamin A-Derivaten wichtige Zusatzstoffe in der Human- und Tierernährung dar. Weiterhin weisen Xanthophylle eine gesundheitsfördernde Wirkung wie die Verstärkung der Immunantwort und, aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften, eine krebsvorbeugende Wirkung auf, was ihre Verwendung als Nutraceuticals interessant macht. Ein wirtschaftliches Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllen sowie Nahrungsmittel mit erhöhtem Xanthophyllgehalt sind daher von großer Bedeutung. Besonders wirtschaftliche Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllen sind biotechnologische Verfahren, die Proteine und Biosynthesegene der Xanthophyll-Biosynthese aus Xanthophyll-produzierenden Organismen nutzen.

Prokaryontische  $\beta$ -Carotin-Hydroxylasen, die die enzymatische Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin über  $\beta$ -Cryptoxanthin katalysieren, sowie die Gene die diese Proteine codieren sind aus den Bakterien *Erwinia uredovora* (Misawa et al., J. of Bacteriology 1990, 6704–6712; EP 393690 B1), *Erwinia herbicola* (WO 9113078), *Agrobacterium aurantiacum* (Misawa et al., J. of Bacteriology 1995, 6575–6584; EP 735 137 A1), *Alcaligenes* sp. PC-1 (EP 735 137 A1), *Flavobacterium* sp. strain R1534 (Pasamontes et al., Gene 1997, 185, 35–41; EP 747483 A2) sowie aus dem *Cyanobacterium Synechocystis* sp. PCC6803 (Masamoto et al., Plant Cell Physiol. 1998, 39(5), 560–564) bekannt.

Ferner ist bekannt, daß die prokaryontischen  $\beta$ -Carotin-Hydroxylasen aus *Agrobacterium aurantiacum*, *Alcaligenes* und *Erwinia uredovora* zusätzlich in der Lage sind, Canthaxanthin über Adonirubin in Astaxanthin umzuwandeln (Misawa et al., J. of Bacteriology 1995, 6575–6584; Fraser et al., J. Biol. Chem. 1997, 272, 6128–6135).

Aus eukaryontischen Quellen sind drei pflanzliche  $\beta$ -Carotin-Hydroxylasen bekannt, die die enzymatische Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin über  $\beta$ -Cryptoxanthin katalysieren. Die entsprechenden cDNAs wurden aus *Arabidopsis thaliana* (Cunningham et al. J. Biol. Chem. 1996, 271, 24349–24352, WO 9736998), sowie aus *Capsicum annuum* L. (Bouvier et al., Biochimica et Biophysica Acta 1998, 1391, 320–328) isoliert.

Gene eukaryontischen Ursprungs haben gegenüber prokaryontischen Genen den Vorteil, daß sie in höheren transgenen Organismen wie Pflanzen besser exprimiert werden. Dennoch besteht für ein wirtschaftliches Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllderivaten oder Nahrungsmitteln mit einem erhöhten Xanthophyllgehalt durch Einbau von eukaryontischen Nukleinsäuren in Organismen nach wie vor ein Bedarf zur Verbesserung und Steigerung der Xanthophyll-Produktivität.

Darüber hinaus haben die entsprechenden eukaryontischen  $\beta$ -Carotin-Hydroxylasen des Standes der Technik den Nachteil, daß sie nur eine geringe Substratbreite aufweisen, so daß sich Stoffwechselprodukte die von den Hydroxylasen nicht umgesetzt werden können, aufstauen und einen inhibierenden Effekt auf die Hydroxylasen ausüben können.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, den geschilderten Mängeln des Standes der Technik abzuhelfen und eine eukaryontische  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase mit verbesserten Eigenschaften zur Verfügung zu stellen.

Demgemäß wurde ein Protein gefunden, das eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin aufweist, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Homologie von mindestens 50% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 aufweist.

Im Folgenden werden unter Carotinhydroxylasen die erfindungsgemäßen Proteine verstanden, also Proteine die eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin aufweisen, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Homologie von mindestens 50% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 aufweist.

Die in SEQ ID NO. 2 dargestellte Aminosäuresequenz beruht auf der Translation der in SEQ ID NO. 1 dargestellten cDNA Sequenz.

Die erfindungsgemäßen Proteine sind in der Lage, die Umwandlung eines  $\beta$ -Ionon-Strukturelements in ein 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie die Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin,  $\beta$ -Carotin in  $\beta$ -Cryptoxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin in Zeaxanthin, Echininen in 3'-Hydroxyechinen, 3-Hydroxyechinen in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin),  $\alpha$ -Carotin in  $\alpha$ -Cryptoxanthin oder weiterer chemischer Verbindung mit bis zu 40 C-Atomen, die einen  $\beta$ -Ionon-Ring enthalten, in die entsprechenden 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Verbindungen oder die Umwandlung eines 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelements in ein 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie die Umwandlung von Canthaxanthin in Astaxanthin, Canthaxanthin in Phoenicoxanthin (Adonirubin), Phoenicoxanthin (Adonirubin) in Astaxanthin, Echininen in 3-Hydroxyechinen, 3'-Hydroxyechinen in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin) oder weiterer chemischer Verbindung mit bis zu 40 C-Atomen, die einen 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Ring enthalten, in die entsprechenden 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Verbindungen zu katalysieren.

Zur Veranschaulichung wird für die Xanthophylle, die sich vom  $\beta$ -Carotin ableiten, auf das Biosyntheseschema in Misawa et al., J. Biotechnol. 1998, 59, Seite 174 (oben) verwiesen. Die Biosynthese von Lutein erfolgt ausgehend von  $\alpha$ -Carotin über  $\alpha$ -Cryptoxanthin.

Die Proteine, die eine von der Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz enthalten, die eine Homologie von mindestens 50% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 aufweist, weisen eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin auf, vorzugsweise in vergleichbarer Aktivität wie das Protein, enthaltend die Sequenz SEQ ID NO. 2.

Unter Substitution ist der Austausch einer oder mehrerer Aminosäuren durch eine oder mehrere Aminosäuren zu ver-

stehen. Bevorzugt werden sog. konservative Austausche durchgeführt, bei denen die ersetzte Aminosäure eine ähnliche Eigenschaft hat wie die ursprüngliche Aminosäure, beispielsweise Austausch von Glu durch Asp, Gln durch Asn, Val durch Ile, Leu durch Ile, Ser durch Thr.

Deletion ist das Ersetzen einer Aminosäure durch eine direkte Bindung. Bevorzugte Positionen für Deletionen sind die Termini des Polypeptides und die Verknüpfungen zwischen den einzelnen Proteindomänen.

Insertionen sind Einfügungen von Aminosäuren in die Polypeptidkette, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Aminosäuren ersetzt wird.

Unter Homologie zwischen zwei Proteinen wird die Identität der Aminosäuren über die jeweils gesamte Proteinlänge verstanden, die durch Vergleich mit Hilfe des Computerprogramms GAP (UWGCG, University of Wisconsin, Genetic Computer Group, Programmalgorithmus nach Needleman und Wunsch, J. Mol. Biol. 1970, 48, 443–453) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

Gap Weight:	12
Length Weight:	4
Average Match:	2,912
Average Mismatch:	-2,003

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Unter einem Protein, das eine Homologie von mindestens 50% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 aufweist, wird dementsprechend ein Protein verstanden, das bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 nach obigen Programmalgorithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 50%, vorzugsweise 60%, besonders bevorzugt 70% aufweist.

Mit den bekannten prokaryontischen  $\beta$ -Carotin-Hydroxylasen weist die erfundungsgemäße Carotinhydroxylase eine Homologie von 29,9% (Flavobacterium), 36,8% (Erwinia uredovora), 38,5% (Erwinia herbicola), 35,0% (Alcaligenes) und 35,6% (Agrobacterium aurantiacum), mit der bekannten eukaryontischen  $\beta$ -Carotin-Hydroxylase aus Arabidopsis thaliana eine Homologie von 41,2% auf.

Bevorzugt ist ein Protein, das eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin und eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von Canthaxanthin in Astaxanthin aufweist, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder ein von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Protein, das eine Homologie von mindestens 50% auf Aminosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO. 2 aufweist.

Diese bevorzugten Proteine sind in der Lage, die Umwandlung eines  $\beta$ -Ionon-Strukturelements in ein 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie die Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin,  $\beta$ -Carotin in  $\beta$ -Cryptoxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin in Zeaxanthin, Echinon in 3'-Hydroxyechinon, 3-Hydroxyechinon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin),  $\alpha$ -Carotin in  $\alpha$ -Cryptoxanthin oder weiterer chemischer Verbindung mit bis zu 40 C-Atomen, die einen  $\beta$ -Ionon-Ring enthalten, in die entsprechenden 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Verbindungen und die Umwandlung eines 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelements in ein 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie die Umwandlung von Canthaxanthin in Astaxanthin, Canthaxanthin in Phoenicoxanthin (Adonirubin), Phoenicoxanthin (Adonirubin) in Astaxanthin, Echinon in 3-Hydroxyechinon, 3'-Hydroxyechinon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin) oder weiterer chemischer Verbindung mit bis zu 40 C-Atomen, die einen 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Ring enthalten, in die entsprechenden 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Verbindungen zu katalysieren.

Ein besonders bevorzugtes Protein ist die eukaryontische Carotinhydroxylase aus der Grünalge Haematococcus pluvialis Flotow NIES-144 mit der Sequenz SEQ ID NO. 2. Dieses besonders bevorzugte Protein ist in der Lage, die Umwandlung eines  $\beta$ -Ionon-Strukturelements in ein 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie die Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin,  $\beta$ -Carotin in  $\beta$ -Cryptoxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin in Zeaxanthin, Echinon in 3'-Hydroxyechinon, 3-Hydroxyechinon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin),  $\alpha$ -Carotin in  $\alpha$ -Cryptoxanthin oder weiterer chemischer Verbindung mit bis zu 40 C-Atomen, die einen  $\beta$ -Ionon-Ring enthalten, in die entsprechenden 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Verbindungen und die Umwandlung eines 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelements in ein 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie die Umwandlung von Canthaxanthin in Astaxanthin, Canthaxanthin in Phoenicoxanthin (Adonirubin), Phoenicoxanthin (Adonirubin) in Astaxanthin, Echinon in 3-Hydroxyechinon, 3'-Hydroxyechinon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin) oder weiterer chemischer Verbindung mit bis zu 40 C-Atomen, die einen 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Ring enthalten, in die entsprechenden 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Verbindungen zu katalysieren.

Die Carotinhydroxylasen lassen sich, wie nachstehend beschrieben durch Genexpression der entsprechenden Nukleinsäuren, die diese Proteine kodieren, aus natürlichen oder genetisch veränderten Organismen herstellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Nukleinsäuren, im folgenden Carotinhydroxylase-Gene genannt, die die vorstehend beschriebenen erfundungsgemäßen Proteine kodieren. Geeignete Nukleinsäuresequenzen sind durch Rückübersetzung der Polypeptidsequenz gemäß dem genetischen Code erhältlich. Bevorzugt werden dafür solche Codons verwendet, die entsprechend der Organismus spezifischen codon usage häufig verwendet werden. Die codon usage lässt sich anhand von Computerauswertungen anderer, bekannter Gene des betreffenden Organismus leicht ermitteln.

Soll das Protein beispielsweise in einer Pflanze exprimiert werden, so ist es häufig vorteilhaft, die codon usage der Pflanze bei der Rückübersetzung zu verwenden.

Eine bevorzugte Nukleinsäure hat die Sequenz SEQ ID NO. 1. Diese Nukleinsäure stellt eine eukaryontische cDNA aus der Grünalge Haematococcus pluvialis Flotow NIES-144 dar, die die Carotinhydroxylase der Sequenz SEQ ID NO. 2 codiert. Da das Leseraster der cDNA bis hin zum 5'-Ende offen ist, stellt die SEQ ID NO. 1 möglicherweise nicht die vollständige Sequenz der cDNA dar. Die Expression dieser cDNA führt zu einem funktionellen Protein. Eine eventuell fehlende Teilsequenz am 5'-Ende kann, in an sich bekannter Weise, durch Analyse von überlappenden cDNA-Fragmenten der cDNA-Bibliothek aus Haematococcus pluvialis Flotow NIES-144 ergänzt werden.

Es ist bekannt, daß die Grünalge Haematococcus pluvialis unter ungünstigen Umweltbedingungen, wie bei einem Phosphat oder Stickstoffdefizit oder bei hoher Lichtintensität zum Schutz vor photooxidativen Stress große Mengen Asta-

xanthin produziert (Kobayashi et al., Appl. Environ. Microbiol. 1993, 59, 867–873; Boussiba et al., Methods Enzymol 1992, 213, 386–391). Dieser Vorgang wird üblicherweise von einer morphologischen Veränderung begleitet, bei der sich die vegetativen Zellen der Grünalgen in Zyst-Zellen entwickeln.

Durch Zugabe von Natriumacetat und FeSO<sub>4</sub> und Erhöhung der Lichtintensität wurde in einer Suspensionskultur von 5 Haematococcus pluvialis Flotow NIES-144 die Astaxanthinbiosynthese und die Zyst-Zellbildung induziert. Aus diesem Stadium wurde zur Konstruktion einer cDNA-Bibliothek die RNA aus Haematococcus pluvialis isoliert. Die cDNA mit der Sequenz SEQ ID NO 1 wurde aus dieser cDNA-Bibliothek isoliert.

Alle vorstehend erwähnten Carotinhydroxylase-Gene sind in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus 10 den Nukleotidbausteinen, wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, Seite 896–897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der 15 DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989); Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine der vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen 20 Carotinhydroxylase-Gene, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen zur Erhöhung der Genexpression verknüpft sind.

Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder 25 anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so daß die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Das Nukleinsäurekonstrukt kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es werden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die vorstehend erwähnten Carotinhydroxylase-Gene inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wird nicht entfernt. Stattdessen wird die natürliche Regulationssequenz so 30 mutiert, daß keine Regulation mehr erfolgt und die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können auch allein vor die natürlichen Gene zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Nukleinsäurekonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nucleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden, wie weitere regulatorische Elemente oder Terminationen. Die vorstehend erwähnten Carotinhydroxylase-Gene können in einer oder mehreren Kopien im Genkonstrukt enthalten sein.

Vorteilhafte Regulationssequenzen für die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte, für das nachstehend beschriebene Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllen und für die nachstehend beschrieben genetisch veränderten Organismen sind beispielsweise in Promotoren wie cos-, tac-, trp-, tet-, trp-tet-, lpp-, lac-, lpp-lac-, lacI<sup>Q</sup>, T7-, T5-, T3-, gal-, trc-, ara-, SP6-, λ-Pr- oder im λ-P<sub>L</sub>-Promotor enthalten, die vorteilhafterweise in gram-negativen Bakterien Anwendung finden.

Weitere vorteilhafte Regulationssequenzen sind beispielsweise in den gram-positiven Promotoren amy und SPO2, in den Hefe- oder Pilzpromotoren ADC1, MFα, AC, P-60, CYC1, GAPDH, TEF, rp28, ADH oder in den Pflanzenpromotoren CaMV/35S [Franck et al., Cell 21(1980) 285–294], PRP1 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22(1993)], SSU, OCS, 40 leb4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor enthalten.

Vorteilhaft sind insbesondere solche pflanzlichen Promotoren, die die spezifische Expression in Geweben oder Pflanzeiteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Carotinoiden bzw. dessen Vorstufen stattfindet oder in denen die Produkte vorteilhafterweise akkumuliert werden.

Insbesondere zu nennen sind Promotoren für die ganze Pflanze aufgrund konstitutiver Expression, wie beispielsweise 45 der CaMV Promotor, der OCS Promotor aus Agrobacterium (Octopin Synthase), der NOS Promotor aus Agrobacterium (Nopaline synthase), der Ubiquitin Promotor, Promotoren vakuolärer ATPase Untereinheiten oder der Promotor eines Prolin-reichen Proteins aus Weizen (Weizen WO 9113991),

samenspezifische Promotoren, wie beispielsweise der Phaseolin Promotor und der USP Promotor aus Vicia faba, der Promotor des Legumin Gens aus Vicia (leb4) oder der Bce4-Gen Promotor aus Brassica (WO 9113980),

spezifische Promotoren für grüne Gewebe, wie beispielsweise der SSU Promotor (small subunit) der Rubisco (Ribulose-1,5-bis-phosphat carboxylase) oder der STLS1 Promotor (*Solanum tuberosum*, light harvesting system 1 aus Kartoffel), mesophyllspezifische Promotoren, wie beispielsweise der FBPase Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel (WO9705900),

spezifische Promotoren für Knollen, Speicherwurzeln oder Wurzeln, wie beispielsweise der Patatin Promotor Klasse I (B33), der Promotor des Cathepsin D Inhibitors aus Kartoffel, der Promotor der Stärke Synthase (GBSS1) oder der Sporamin Promotor,

fruchtspezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtspezifische Promotor aus Tomate (EP409625),

fruchtreifung-spezifische Promotoren, wie beispielsweise der fruchtreifung-spezifische Promotor aus Tomate (WO 9421794),

blütenspezifische Promotoren, wie beispielsweise der Phytoen Synthase Promotor (WO9216635) oder der Promotor des P-rr Gens (WO9822593),

spezifische Plastiden- oder Chromoplasten-Promotoren, wie beispielsweise der RNA-Polymerase Promotor (WO9706250) oder

pathogen oder chemisch induzierbare Promotoren, wie beispielsweise der PRP1-Promotor, ein durch Benzensulfonamid-induzierbarer (EP 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397–404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP335528) oder ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO9321334) Promotor.

Auch der Promotor der Phosphoribosylpyrophosphat Amidotransferase aus Glycine max (siehe auch Genbank Access-

# DE 199 16 140 A 1

sion Nummer U87999) oder ein anderer Nodien-spezifischer Promotor wie in EP 249676 können vorteilhaft verwendet werden.

Prinzipiell können alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen wie die oben genannten für das erfundungsgemäße Verfahren verwendet werden. Darüberhinaus können auch synthetische Promotoren vorteilhaft verwendet werden.

Im Nukleinsäurekonstrukt können noch weitere Gene, die in die Organismen eingebracht werden sollen, enthalten sein. Diese Gene können unter getrennter Regulation oder unter der gleichen Regulationsregion wie die vorstehend beschriebenen Carotinhydroxylase-Gene liegen. Bei diesen Genen handelt es sich beispielsweise um weitere Biosynthese-gene der Carotinoidbiosynthese, die eine gesteigerte Synthese ermöglichen. Insbesondere seien weitere Gene der Carotinoidbiosynthese genannt, die biochemisch limitierend sind, wie die Gene codierend die Phytoensynthase, Phytoendesaturase, Isopentylpyrophosphat Isomerase oder die  $\beta$ -Cyclase.

Gene, codierend eine Isopentylpyrophosphat Isomerase sind beispielsweise aus den Organismen *Phaffia rhodozyma* und *Haematococcus pluvialis* (EP 769 551) oder *Arabidopsis thaliana* und *Tagetes* (Marigold) (WO 9736998) bekannt.

Gene, codierend eine Phytoensynthase sind beispielsweise aus den Organismen *Erwinia uredovora* (EP 393690), *Erwinia herbicola* (WO 9113078), Tomate (WO 9109128), Melone (WO 9602650), *Flavobacterium* (EP 747483) oder *Nicotiana* (US 5705624) bekannt.

Gene, codierend eine Phytoendesaturase sind beispielsweise aus den Organismen *Erwinia uredovora* (EP 393690), *Erwinia herbicola* (WO 9113078), *Nicotiana* (US 5539093) oder *Flavobacterium* (EP 747483) bekannt.

Gene, codierend eine  $\beta$ -Cyclase sind beispielsweise aus den Organismen *Erwinia uredovora* (EP 393690), *Erwinia herbicola* (WO 9113078), *Flavobacterium* (EP 747483), Tabak und Tomate (WO 9628014) oder *Capsicum annuum* (WO 9636717) bekannt.

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung der nachstehend beschriebenen, genetisch veränderten Organismen, wobei man die erfundungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene oder die erfundungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte in das Genom des Ausgangsorganismus einführt. Unter Ausgangsorganismen werden die Organismen vor der erfundungsgemäßen genetischen Veränderung verstanden.

Die erfundungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene oder die erfundungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte lassen sich prinzipiell über alle dem Fachmann bekannten Methoden in die nachstehend beschriebenen Ausgangsorganismen, die dadurch genetisch verändert werden, einführen.

Vorteilhaft werden sie über Transformation, Transfektion, Elektroporation, mit der sog. Partikelgun oder über Mikroinjektion in die Ausgangsorganismen bzw. deren Zellen eingebracht.

Für Mikroorganismen kann der Fachmann entsprechende Methoden den Lehrbüchern von Sambrook, J. et al. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, von F. M. Ausubel et al. (1994) Current protocols in molecular biology, John Wiley and Sons, von D. M. Glover et al., DNA Cloning Vol. 1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), von Kaiser et al. (1994) Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Habor Laboratory Press oder Guthrie et al. Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, 1994, Academic Press entnehmen.

Als vorteilhaft seien beispielhaft Methoden wie das Einbringen der DNA über homologe oder heterologe Rekombination beispielsweise mit Hilfe des ura-3-Gens, speziell des ura-3-Gens von *Ashbya*, wie in der deutschen Anmeldung DE 198 01 120.2 beschrieben und/oder über die im folgenden beschriebene REMI-Methode (= "Restriktion-Enzyme-Mediated-Integration"), genannt.

Die REMI-Technik basiert auf der Kotransformation eines linearen DNA-Konstruktes, das an beiden Enden mit derselben Restriktionsendonuklease geschnitten wurde, zusammen mit der Restriktionsendonuklease, die für diese Restriktion des DNA-Konstrukts verwendet wurde, in einen Organismus. Die Restriktionsendonuklease schneidet daraufhin die genomische DNA des Organismus, in den das DNA-Konstrukt zusammen mit dem Restriktionsenzym eingebracht wurde. Dies führt zu einer Aktivierung der zelleigenen Reparaturmechanismen. Diese Reparaturmechanismen reparieren die durch die Endonuklease hervorgerufene Strangbrüche der genomischen DNA und bauen dabei mit einer gewissen Frequenz auch das kotransformierte DNA-Konstrukt mit ins Genom ein. In der Regel bleiben dabei die Restriktions-schnittstellen an beiden Enden der DNA erhalten.

Diese Technik wurde von Böcker et al. (Mol Gen Genet, 248, 1995: 547–552) für die Insertionsmutagenese von Pilzen beschrieben. Von Schiestl und Petes (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 1991: 7585–7589) wurde die Methode zur Aufklärung, ob es bei *Saccharomyces* eine heterologe Rekombination gibt, verwendet. Zur stabilen Transformation und regulierten Expression eines induzierbaren Reportergens wurde die Methode von Brown et al. (Mol. Gen. Genet. 251, 1996: 75–80) beschrieben.

Mit Hilfe der REMI-Methode können die erfundungsgemäßen Nukleinsäurefragmente oder die vorstehend genannten, erfundungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene an transcriptionsaktive Stellen im Genom plaziert werden.

Vorteilhafterweise können die Nukleinsäuren zusammen mit mindestens einem Reporterogen in ein DNA-Konstrukt kloniert werden, das in das Genom eingebracht wird. Dieses Reporterogen sollte eine leichte Detektierbarkeit über einen Wachstums-, Fluoreszenz-, Chemo- oder Biolumineszenzassay oder über eine photometrische Messung ermöglichen. Beispielhaft seien als Reporterogene Antibiotikaresistenzgene, Hydrolasegene, Fluoreszenzproteingene, Biolumineszenzgene, Glucosidasegene, Peroxidasegen das Luciferasegen,  $\beta$ -Galactosidasegen, gfp-Gen, Lipasegen, Esterasegen, Peroxidasegen,  $\beta$ -Lactamasegen, Acetyl-, Phospho- oder Adenyltransferasegen genannt. Diese Gene ermöglichen eine leichte Meßbarkeit und Quantifizierbarkeit der Transcriptionsaktivität und damit der Expression der Gene. Damit lassen sich Genomstellen identifizieren, die eine bis zu Faktor 2 unterschiedliche Produktivität zeigen.

Sollen mehrere Gene, wie beispielsweise weitere crt-Gene der Carotinoidbiosynthese in den Organismus eingeführt werden, so können alle zusammen mit einem Reporterogen in einem einzigen Vektor oder jedes einzelne Gen mit einem Reporterogen in je einem Vektor in den Organismus eingebracht werden, wobei die verschiedenen Vektoren gleichzeitig oder sukzessive eingebracht werden können. Auch Genfragmente, die für die jeweiligen Aktivitäten kodieren, können in der REMI-Technik eingesetzt werden.

Für die Integration der erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene oder Nukleinsäurekonstrukte in das Genom von Ausgangsorganismen eignen sich prinzipiell alle bekannten Restriktionsenzyme.

Restriktionsenzyme, die nur 4 Basenpaare als Restriktionsschnittstelle erkennen, sind weniger bevorzugt, da sie zu häufig im Genom oder im zu integrierenden Vektor schneiden, bevorzugt sind Enzyme, die 6, 7, 8 oder mehr Basenpaare als Schnittstelle erkennen, wie BamHI, EcoRI, BglII, SphI, SpeI, XbaI, XhoI, NcoI, SalI, ClaI, KpnI, HindIII, SacI, PstI, Bpu1, NotI, SrfI oder SfiI, um nur einige der möglichen Enzyme zu nennen. Von Vorteil ist, wenn die verwendeten Enzyme keine Schnittstellen mehr in der einzuführenden DNA haben, dies erhöht die Effizienz der Integration. In der Regel werden 5 bis 500 U, bevorzugt 10 bis 250, besonders bevorzugt 10 bis 100 U der Enzyme im REMI-Ansatz verwendet. Die Enzyme werden vorteilhaft in einer wäßrigen Lösung eingesetzt, die Substanzen zur osmotischen Stabilisierung wie Zucker, wie Saccharose, Trehalose oder Glucose, Polyole wie Glycerin oder Polyethylenglycol, einen Puffer mit einer vorteilhaften Pufferung im Bereich von pH 5 bis 9, bevorzugt 6 bis 8, besonders bevorzugt 7 bis 8 wie Tris, MOPS, HEPES, MES oder PIPES und/oder Substanzen zur Stabilisierung der Nukleinsäuren enthalten, wie anorganische oder organische Salze von Mg, Cu, Co, Fe, Mn oder Mo. Es können gegebenenfalls noch weitere Stoffe enthalten sein wie EDTA, EDDA, DTT, β-Mercaptoethanol oder Nukleasehemmstoffe. Es ist aber auch möglich die REMI-Technik ohne diese Zusätze durchzuführen.

Das Verfahren wird in einem Temperaturbereich von 5 bis 80°C, bevorzugt von 10 bis 60°C, besonders bevorzugt von 20 bis 40°C durchgeführt. Für das Verfahren eignen sich alle bekannten Methoden zur Destabilisierung von Zellmembranen wie beispielsweise die Elektroporation, die Fusion mit beladenen Vesikeln oder die Destabilisierung über verschiedene Alkali- oder Erdalkalisalze wie Lithium, Rubidium- oder Calciumsalze, bevorzugt sind die Lithiumsalze.

Die Nukleinsäuren können nach dem Isolieren direkt oder nach Aufreinigung für die erfindungsgemäße Reaktion verwendet werden.

Das Einbringen der erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene oder der erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte in Pflanzen kann prinzipiell nach allen dem Fachmann bekannten Methoden erfolgen.

Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen Transformation genutzt.

Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, die Verwendung einer Genkanone, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S. D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993) 128–143 sowie in Potrykus Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991) 205–225) beschrieben.

Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984) 8711). Die Transformation mit Agrobacterium tumefaciens wird beispielsweise von Höfgen und Willmitzer in Nucl. Acid Res. s. (1988) 16, 9877 beschrieben.

Mit einem erfindungsgemäßen Expressionsvektor transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Tagetes, Sonnenblume, Arabidopsis, Tabak, Roter Pfeffer, Soja, Tomate, Aubergine, Paprika, Möhre, Karotte, Kartoffel, Mais, Salate und Kohlarten, Hafer, Roggen, Weizen, Triticale, Hirse, Reis, Luzerne, Flachs, Brassicaceen wie beispielsweise Raps oder Canola, Zuckerrübe, Zuckerrohr oder von Holzgewächsen wie beispielsweise Espe oder Eibe verwendet werden, z. B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.

Die genetisch veränderten Pflanzenzellen können über alle dem Fachmann bekannten Methoden regeneriert werden. Entsprechende Methoden können den oben genannten Schriften von S. D. Kung und R. Wu, Potrykus oder Höfgen und Willmitzer entnommen werden.

Es gibt eine Vielzahl von Möglichkeiten die Enzymaktivität der Carotinhydroxylase-Genprodukte in der Zelle zu erhöhen.

Eine Möglichkeit besteht darin, die endogenen Carotinhydroxylase-Gene zu verändern, daß sie für Enzyme mit gegenüber den Ausgangsenzymen erhöhter Carotinhydroxylase-Aktivität kodieren. Eine andere Erhöhung der Enzymaktivität kann beispielsweise erreicht werden, indem durch Veränderung der katalytischen Zentren ein erhöhter Substratumsatz erfolgt oder indem die Wirkung von Enzyminhibitoren aufgehoben wird, das heißt sie weisen eine erhöhte spezifische Aktivität auf oder ihre Aktivität wird nicht gehemmt. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität in einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform durch Erhöhung der Enzymsynthese in der Zelle erfolgen, beispielsweise durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzymsynthese reprimieren oder durch Erhöhung der Aktivität von Faktoren oder Regulatorelementen, die eine verstärkte Synthese fördern, oder bevorzugt durch Einbringen weiterer Genkopien. Durch diese Maßnahmen wird die Gesamtaktivität der Genprodukte in der Zelle erhöht, ohne die spezifische Aktivität zu verändern. Es kann auch eine Kombination dieser Methoden verwendet werden, das heißt Erhöhung der spezifischen Aktivität sowie Erhöhung der Gesamtaktivität. Diese Änderungen können prinzipiell über alle dem Fachmann bekannten Methoden in die Nukleinsäuresequenzen der Gene, Regulationselemente oder deren Promotoren eingebracht werden. Hierzu können die Sequenzen beispielsweise einer Mutagenese, wie einer "site directed mutagenesis" unterzogen werden, wie sie in D. M. Glover et al., DNA Cloning Vol. 1, (1995), IRL Press (ISBN 019-963476-9), Kapitel 6, Seite 193 ff beschrieben wird.

Von Spee et al. (Nucleic Acids Research, Vol. 21, No. 3, 1993: 777–778) wird eine PCR-Methode unter Verwendung von dITP zur zufälligen Mutagenese beschrieben.

Die Verwendung einer "in vitro" Rekombinationstechnik für die molekulare Evolution wird von Stemmer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91, 1994: 10747–10751) beschrieben.

Von Moore et al. (Nature Biotechnology Vol. 14, 1996: 458–467) wird die Kombination der PCR- und Rekombinationsmethode beschrieben.

Die veränderten Nukleinsäuresequenzen werden anschließend wieder über Vektoren in die Organismen zurückge-

bracht.

Es können zur Erhöhung der Enzymaktivitäten auch veränderte Promotorbereiche vor die natürlichen Gene gebracht werden, so daß die Expression der Gene gesteigert wird und damit die Aktivität letztlich angehoben wird. Auch am 3'-Ende können Sequenzen eingebracht werden, die beispielsweise die Stabilität der mRNA erhöhen und dadurch eine erhöhte Translation ermöglichen. Dies führt ebenfalls zu einer höheren Enzymaktivität.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden die erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene oder Nukleinsäurekonstrukte zur Expression in einem der nachstehend beschriebenen Organismen in einen Vektor wie beispielsweise einem Plasmid, einem Phagen oder sonstiger DNA insertiert, das eine optimale Expression der Gene in den prokaryontischen oder eukaryontischen Organismen ermöglicht. Dieser Vektor kann zur Expression des erfindungsgemäßen Proteins das Startcodon ATG enthalten.

Geeignete Plasmide sind beispielsweise in *E. coli* pLG338, pA-CYC184, pBR322, pUC18, pUC19, pKC30, pRep4, pHs1, pHs2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III<sup>113</sup>-B1, λgt11, pBdCI, die pET Vektorserie (Novagen und Stratagene), pMAL oder die pQE Vektorserie (Qiagen), in Pilzen pALS1, pIL2 oder pBB116, in Hefen 2 μM, pAG-1, YEp6, YEp13 oder pEMBLYe23 oder in Pflanzen pLGV23, pGHlac<sup>+</sup>, pBIN19, pAK2004, pDH51, oder Derivate der vorstehend genannten Plasmide.

Die genannten Plasmide stellen eine kleine Auswahl der möglichen Plasmide dar. Weitere Plasmide sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus dem Buch Cloning Vectors (Eds. Pouwels P. H. et al. Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018) entnommen werden. Geeignete pflanzliche Vektoren werden unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71-119 beschrieben.

Vorteilhafterweise enthält das Nukleinsäurefragment zur Expression der weiteren enthaltenen Gene zusätzlich noch 3' und/oder 5' terminale regulatorische Sequenzen zur Steigerung der Expression, die je nach ausgewähltem Wirtsorganismus und Gen oder Gene für eine optimale Expression ausgewählt werden.

Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, daß das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder daß es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhaft auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

In einer weiteren Ausgestaltungsform des Vektors kann das erfindungsgemäße Nukleinsäurekonstrukt auch vorteilhaft in Form einer linearen DNA in die Wirtsorganismen eingeführt werden und über heterologe oder homologe Rekombination in das Genom des Wirtsorganismus integriert werden. Diese lineare DNA kann aus einem linearisierten Plasmid oder nur aus dem Nukleinsäurefragment als Vektor bestehen.

Als Vektor kann auch ein beliebiges Plasmid verwendet werden, das in der Zelle autonom repliziert, aber auch wie oben beschrieben ein lineares DNA-Fragment, das in das Genom des Wirtes integriert. Diese Integration kann über hetero- oder homologe Rekombination erfolgen. Bevorzugt wie erwähnt jedoch über homologe Rekombination (Steiner et al., Genetics, Vol. 140, 1995: 973-987). Dabei können die vorstehend erwähnten Carotinhydroxylase-Gene einzeln im Genom an verschiedenen Orten oder auf verschiedenen Vektoren vorliegen oder gemeinsam im Genom oder auf einem Vektor vorliegen.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung der erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen.

Ferner betrifft die Erfindung einen entsprechend genetisch veränderten Organismus, wobei die genetische Veränderung die Genexpression der erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene gegenüber einem Wildtyp für den Fall, daß der Ausgangsorganismus ein erfindungsgemäßes Carotinhydroxylase-Gen enthält, erhöht oder für den Fall, daß der Ausgangsorganismus ein erfindungsgemäßes Carotinhydroxylase-Gen nicht enthält, verursacht.

Unter einem genetisch veränderten Organismus wird ein Organismus verstanden, in dem die erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene oder Nukleinsäurekonstrukte, vorzugsweise nach einer der vorstehend beschriebenen Methoden, insertiert wurden.

Der genetisch veränderte Organismus enthält mindestens ein erfindungsgemäßes Carotinhydroxylase-Gen oder mindestens ein erfindungsgemäßes Nukleinsäurekonstrukt. Je nach Ausgangsorganismus kann die Nukleinsäure chromosomal oder extrachromosomal vorliegen.

Vorzugsweise weisen die genetisch veränderten Organismen verglichen mit dem Wildtyp einen veränderten Carotinoid-Stoffwechsel auf.

Als genetisch veränderte Organismen eignen sich prinzipiell alle Organismen, die in der Lage sind Xanthophylle zu synthetisieren.

Bevorzugt sind Ausgangsorganismen, die natürlicherweise Xanthophylle synthetisieren können. Aber auch Ausgangsorganismen, die aufgrund des Einbringens von Genen der Carotinoidbiosynthese in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, sind geeignet.

Unter Ausgangsorganismen werden prokaryontische oder eukaryontische Organismen wie beispielsweise Mikroorganismen oder Pflanzen verstanden. Bevorzugte Mikroorganismen sind Bakterien, Hefen, Algen oder Pilze.

Als Bakterien können sowohl Bakterien verwendet werden, die aufgrund des Einbringens von Genen der Carotinoidbiosynthese eines Carotinoid-produzierenden Organismus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren, wie beispielsweise Bakterien der Gattung Escherichia, die beispielsweise crt-Gene aus Erwinia enthalten, als auch Bakterien, die von sich aus in der Lage sind, Xanthophylle zu synthetisieren wie beispielsweise Bakterien der Gattung Erwinia, Agrobacterium, Flavobacterium, Alcaligenes oder Cyanobakterien der Gattung Synechocystis. Bevorzugte Bakterien sind Escherichia coli, Erwinia herbicola, Erwinia uredovora, Agrobacterium aurantiacum, Alcaligenes sp. PC-1, Flavobacterium sp. strain R1534 oder das Cyanobakterium Synechocystis sp. PCC6803.

# DE 199 16 140 A 1

Bevorzugte Hefen sind *Candida*, *Saccharomyces*, *Hansenula* oder *Pichia*.

Bevorzugte Pilze sind *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Ashbya*, *Neurospora*, *Fusarium* oder weitere in Indian Chem. Engr. Section B. Vol. 37, No. 1, 2 (1995) auf Seite 15, Tabelle 6 beschriebene Pilze.

Bevorzugte Algen sind Grünalgen, wie beispielsweise Algen der Gattung *Haematococcus*, *Phaedactylum tricornatum*, *Volvox* oder *Dunaliella*. Besonders bevorzugte Algen sind *Haematococcus pluvialis* oder *Dunaliella bardawil*.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Pflanzen als Ausgangsorganismen und dementsprechend auch als genetisch veränderte Organismen verwendet. Bevorzugte Pflanzen sind beispielsweise *Tagetes*, Sonnenblume, *Arabidopsis*, Tabak, Roter Pfeffer, Soja, Tomate, Aubergine, Paprika, Möhre, Karotte, Kartoffel, Mais, Salate und Kohlarten, Haf er, Roggen, Weizen, *Triticale*, Hirse, Reis, Luzerne, Flachs, Brassicaceae wie beispielsweise Raps oder Canola, Zuckerrübe, Zuckerrohr oder Holzgewächse wie beispielsweise Espe oder Eibe.

Besonders bevorzugt sind *Arabidopsis thaliana*, *Tagetes erecta*, Raps, Canola, Kartoffeln sowie Ölsaaten und typische Carotinoidproduzenten, wie Soja, Sonnenblume, Paprika, Karotte, Pfeffer oder Mais.

Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllderivaten, dadurch gekennzeichnet, daß man ein  $\beta$ -Ionon-Strukturelement zu einem 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Strukturelement und/oder ein 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement zu einem 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement in Gegenwart des erfindungsgemäßen Proteins umsetzt.

Unter Xanthophyllderivaten werden Xanthophylle, vorzugsweise Xanthophylle die mindestens eine Hydroxygruppe enthalten, wie beispielsweise Zeaxanthin,  $\beta$ -Cryptoanthin, 3'-Hydroxyechinenon, 3-Hydroxyechinenon, Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin), Astaxanthin, Phoenicoanthin (Adonirubin),  $\alpha$ -Cryptoanthin oder Lutein oder davon abgeleitete Derivate mit bis zu 40 C-Atomen, die im Molekül zumindest ein 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon- oder zumindest ein 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement enthalten, wie beispielsweise 3-Hydroxy-6-Vinyl- $\beta$ -Ionon, 3-Hydroxy-4-Keto-6-Vinyl- $\beta$ -Ionon, 3-Hydroxy-retinol, 3-Hydroxy-4-Keto-retinol, 3-Hydroxy-retinal, 3-Hydroxy-4-Keto-retinal, 3-Hydroxy-retinsäure oder 3-Hydroxy-4-Keto-retinsäure verstanden.

Bevorzugte Xanthophyllderivate sind Zeaxanthin, Lutein und Astaxanthin.

Im erfindungsgemäßen Verfahren wird in Gegenwart der erfindungsgemäßen Proteine ein  $\beta$ -Ionon-Strukturelement in ein 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin,  $\beta$ -Carotin in  $\beta$ -Cryptoanthin,  $\beta$ -Cryptoanthin in Zeaxanthin, Echinon in 3'-Hydroxyechinenon, 3-Hydroxyechinenon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin),  $\alpha$ -Carotin in  $\alpha$ -Cryptoanthin oder eine chemische Verbindung mit bis zu 40 C-Atomen, die einen  $\beta$ -Ionon-Ring enthält, in die entsprechende 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Verbindung oder ein 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement in ein 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie Canthaxanthin in Astaxanthin, Canthaxanthin in Phoenicoanthin (Adonirubin), Phoenicoanthin (Adonirubin) in Astaxanthin, Echinon in 3-Hydroxyechinenon, 3'-Hydroxyechinenon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin) oder eine chemische Verbindung mit bis zu 40 C-Atomen, die einen 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Ring enthält, in die entsprechende 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Verbindung umgesetzt.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens kultiviert man einen erfindungsgemäßen, vorstehend erwähnten genetisch veränderten Organismus, erntet diesen Organismus und isoliert anschließend die Xanthophyllderivate aus dem Organismus.

Die Kultivierung des erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Organismus erfolgt in an sich bekannter Weise wie die Kultivierung des entsprechenden Wildtyps, beispielsweise bei Mikroorganismen in einem geeigneten Medium, wie beispielsweise auf Agar-Platten oder in Suspensionskultur oder bei Pflanzen in Erde oder entsprechend geeigneten Nährböden.

Unter Ernten wird im Falle von Mikroorganismen das Isolieren der Mikroorganismen bei Pflanzen das Abschneiden der Pflanze oder gegebenenfalls bestimmter, die Xanthophyllderivate enthaltende Pflanzenteile verstanden.

Die Isolierung der Xanthophyllderivate erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Aufschluß der Organismus-Zellen, Extraktion der Xanthophyllderivate und anschließender Aufreinigung der Xanthophyllderivate durch chemische oder physikalische Trennmethoden, wie Extraktion oder Chromatographie.

Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase oder der erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gene zur Herstellung von Xanthophyllderivaten.

Die nachstehenden Beispiele verdeutlichen die Erfindung.

## Beispiel 1

50 Einbau des Carotinhydroxylase-Gens in einen  $\beta$ -Carotin produzierenden *E. coli*, Fermentation des transgenen Organismus und Isolierung der Xanthophylle

### Allgemeine Arbeitsvorschriften

#### Isolierung der Carotinoide

Zur Isolierung der Carotinoide (Carotine und Xanthophylle) wurden die *E. coli* Zellen durch Zentrifugieren gesammelt und das erhaltene Zellmaterial 24 h gefriergetrocknet. Die gefriergetrockneten Zellen wurden in Aceton resuspendiert und zweimal bei 55°C mit Aceton 15 min extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit einem Diethylether/Petrolether(S. p. 35–80°C)-Gemisch (1 : 9, v/v) in einem Scheidetrichter gewaschen und unter Stickstoff im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingeengt.

#### HPLC Analyse

65 Die Auftrennung der Extrakte erfolgte mit Hilfe einer Nucleosil 100-5 C18-Säule (Macherey-Nagel) bei einem Eluenten-Flow von 1,5 ml/min.

Für die Auftrennung von  $\beta$ -Carotin und den hydroxylierten Xanthophyllell in Beispiel 1 wurde ein Acetonitril/Metha-

nol/2-Propanol-Gemisch (85 : 10 : 5, v/v/v; flow) als Eluent verwendet. Zur Auftrennung der Ketogruppen-tragenden Xanthophylle in Beispiel 2 wurde ein Acetonitril/Methanol/H<sub>2</sub>O-Gemisch (50 : 44 : 6, v/v/v) 22 min als Eluent 1 und Methanol als Eluent 2 verwendet. Die Detektion erfolgte direkt unter Verwendung des Waters 994 diode array-Detektors. Als Vergleichsstandard für die HPLC-Analyse wurden β-Carotin, Astaxanthin and Zeaxanthin von den Firmen Sigma oder Roth bezogen.

5

### 1.1 Herstellung des β-Carotin produzierenden E. Coli

Als Organismus wurden *E. coli*-Zellen strain JM101 verwendet. Das Plasmid pACCAR16DcrtX enthält die bakteriellen Carotinoid-Biosynthese-Gene crtE, crtB, crtI und crtY aus *Erwinia uredovora* und führt zur Biosynthese von β-Carotin (N. Misawa et al., J. Bacteriol. 172 (1990) 6704–6712; Biochem. Biophys. Res. Commun. 209 (1995) 867–876).

10

Zur Herstellung dieses Plasmids wurde ein 6,0 kb Asp718 (KpnI)-EcoRI-Fragment des Carotinoid-Biosynthesegen-Clusters aus *Erwinia uredovora* (Plasmid pCAR16delB) in die EcoRI-Stelle des Plasmids pACY184 (R. E. Rose, Nucl. Acids Res. 16 (1988) 355) kloniert. Das Plasmid pCAR16delB enthält eine Rahmenverschiebungs-Mutation im ORF (open reading frame) der β-Carotin-Hydroxylase (Misawa et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 209 (1995) 867–876). Daher kann das anfallende β-Carotin nicht zu Zeaxanthin hydroxyliert werden.

15

Die Insertion des Plasmids pACCAR16DcrtX in *E. coli* und die Herstellung und Isolierung von transformierten *E. coli*-Zellen erfolgte in an sich bekannter Weise, wie in Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989, beschrieben.

20

### 1.2 Konstruktion einer *Haematococcus pluvialis* λcDNA Expressionsbibliothek und Isolierung des Plasmids, das das Carotin-Hydroxylase-Gen enthält

25

*Haematococcus pluvialis* Flotow NIES-144 stammte vom National Institute for Environmental Studies (NIES), Tsukuba, Japan. Das Basal-Medium (pH 6,8) in der Wachstumsphase von *Haematococcus pluvialis* enthielt pro Liter 1,2 g Natriumacetat, 2,0 g Hefe-Extrakt, 0,4 g L-Asparagin, 0,2 g MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0,01 g FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O und 0,02 g CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O. *Haematococcus pluvialis* wurde 4 Tage lang bei 20°C in einem Dunkel/Licht-Zyklus von 12 h Licht (20 μE/m<sup>2</sup> s) und 12 h Dunkelheit vermehrt.

25

Zur Induktion der Astaxanthin Biosynthese und zur Zyst-Zellbildung, wurden nach 4 Tagen Natriumacetat und FeSO<sub>4</sub> bis zu einer Konzentration von 45 mM bzw. 450 μM zugegeben. Nach der Zugabe wurden, wie in Kajiwara et al., Plant Mol. Biol. 29 (1995) 343–552 beschrieben, die Lichtverhältnisse auf kontinuierliches Licht (125 μE/m<sup>2</sup> s) umgestellt.

30

Nach 8 h Induktion der Zyst-Zellen-Bildung wurden die RNAs von *Haematococcus pluvialis* zur Konstruktion einer cDNA Bibliothek, aus den Zyst-Zellen isoliert.

Die Reinigung der poly(A)RNA wurde unter Verwendung von Oligo (dT)-Cellulose (Biolabs) durchgeführt. Die Synthese der cDNAs und die Konstruktion der λZAP-Expressions-Bibliothek erfolgte mit Hilfe des cDNA Synthesis and ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kits (Stratagene). Die Erstrang cDNA-Synthese wurde unter Verwendung der MMLV-Reverse Transkriptase und einem Poly (dT) Primer, der eine XhoI-Restriktionsenzym Erkennungsstelle enthält, entsprechend der Stratagene Gebrauchsanweisung durchgeführt. Dementsprechend wurde die Synthese des zweiten Strangs unter Verwendung der DNA Polymerase I durchgeführt. Durch Auffüllen mit Pfu-DNA-Polymerase wurden glatte DNA-Enden erzeugt, an die EcoRI Adaptoren ligiert wurden. Die erhaltenen cDNA-Fragmente wurden anschließend nach der Größe fraktioniert und anschließend in die EcoRI-XhoI-Erkennungsstelle des Uni-ZAP XR Vektors ligiert. Nach Isolierung und Reinigung des positiven Carotinhydroxylase-Plaques wurde das pBluescript Phagmid, das die Carotinhydroxylase-cDNA enthält, durch in-vivo-herausschneiden unter Verwendung des ExAssist Hilfsphagen und dem SOLR *E. coli* strain, entsprechend der Gebrauchsanleitung von Stratagene, zurückerhalten. Das erhaltene Plasmid enthält zusätzlich zu den kurzen Adapter-Sequenzen am 5'- (5'-AATTCCGGCACGAG-3') und am 3'-Ende (5'-TCGAG-3') nach der DNA-Sequenz-Analyse ein 1608 bb langes cDNA-Fragment ligiert in die EcoRI und XhoI Restriktionsstelle der multiplen Klonierungsstelle. Dieses Plasmid wurde zur Insertion des Carotinhydroxylase-Gens in die, wie unter 1.1. beschriebenen, β-Carotin-produzierenden *E. coli*-Zellen verwendet.

35

40

45

### 1.3. Einbau des Carotinhydroxylase-Gens in β-Carotin-produzierende *E. coli*-Zellen, Kultivieren der transformierten Zellen und Isolierung der Xanthophylle Zeaxanthin und β-Cryptoxanthin

50

Die Transformation der unter 1.1. beschriebenen, β-Carotin-produzierenden *E. coli*-Zellen, enthaltend das Plasmid pACCAR16DcrtX mit dem unter 1.3 beschriebenen Plasmid, enthaltend das Carotinhydroxylase-Gens, erfolgte in an sich bekannter Weise wie in J. Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989, beschrieben.

55

Die transformierten *E. coli*-Zellen wurden 48 h in LB Medium bei 28°C unter Zugabe von Ampicillin (50 μg/ml; für das Plasmid enthaltend die Carotinhydroxylase) und Chloramphenicol (30 μg/ml; Plasmid pACCAR16DcrtX) gezüchtet.

60

Die Isolierung der Carotinoide erfolgte wie unter den allgemeinen Arbeitsvorschriften beschrieben. Fig. 1 zeigt die HPLC-Diagramme der Carotinoide extrahiert aus

- (A) *E. coli*-Zellen, enthaltend das Plasmid pACCAR16DcrtX nach 1.1 und
- (B) *E. coli*-Zellen, enthaltend das Plasmid pACCAR16DcrtX zusammen mit dem Carotinhydroxylase-Gen nach 1.2.

65

In Fig. 1 bedeuten die Peak-Nummern

3 Zeaxanthin

5 β-Cryptoxanthin

6  $\beta$ -Carotin

Wie man Fig. 1 entnehmen kann, produzieren die transformierten E. coli-Zellen durch Einbau des erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gens die hydroxylierten Xanthophylle Zeaxanthin und  $\beta$ -Cryptoxanthin, während ohne die Transformation nur  $\beta$ -Carotin produziert wird. Die erfindungsgemäße Carotinhydroxylase ist dementsprechend in der Lage  $\beta$ -Carotin in  $\beta$ -Cryptoxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin in Zeaxanthin oder  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin umzuwandeln.

## Beispiel 2

10 Einbau des Carotinhydroxylase-Gens und des  $\beta$ -Carotin-Ketolase-Gens (bkt) aus Haematococcus pluvialis in  $\beta$ -Carotinproduzierende E. coli-Zellen, Kultivieren der transformierten Zellen und Isolierung der Xanthophylle Astaxanthin, Canthaxanthin, Adonixanthin, Zeaxanthin und  $\beta$ -Cryptoxanthin

2.1 Herstellung eines Plasmids enthaltend das  $\beta$ -Carotin-Ketolase-Gen (bkt) aus Haematococcus pluvialis

15 Zur Herstellung des Plasmids pRKbkt1 (Kajiwara et al., Plant Mol. Biol. 29 (1995) 343–552), enthaltend das  $\beta$ -Carotin-Ketolase-Gen aus Haematococcus pluvialis wurde ein 1 kb PvUII-partialverdautes Produkt des Plasmids pUC19bkt durch Agarosegelektrophorese aufgetrennt (Breitenbach et al., FEMS Microbiol. Lett. 140 (1996) 241–246.) Dieses DNA-Fragment enthält den lacZ-Promoter zusammen mit dem ORF (open reading frame) der Ketolase und wurde in das Plasmid pRK404, das zuvor mit HindIII verdaut und mit dem Klenow Enzym behandelt wurde, subkloniert.

20 Das erhaltene Plasmid pRKbkt1 wurde einmal alleine und einmal zusammen mit dem unter 1.2 beschriebenen Carotinhydroxylase-Gen-Plasmid in die  $\beta$ -Carotin-produzierenden E. coli-Zellen insertiert.

2.2 Einbau des Plasmid pRKbkt1 in  $\beta$ -Carotin-produzierende E. coli-Zellen, Kultivieren der transformierten Zellen und Isolierung des Xanthophylls Canthaxanthin

25 Die Transformation der unter 1.1. beschriebenen,  $\beta$ -Carotin-produzierenden E. coli-Zellen, enthaltend das Plasmid pACCAR16DcrtX mit dem unter 2.1 beschriebenen Plasmid pRKbkt1, enthaltend das  $\beta$ -Carotin-Ketolase-Gen (bkt), erfolgte in an sich bekannter Weise wie in J. Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989, beschrieben.

30 Die transformierten E. coli-Zellen wurden analog wie unter 1.3 beschrieben 48 h in LB Medium bei 28°C, allerdings unter Zugabe von Chloramphenicol (30 µg/ml; Plasmid pACCAR16DcrtX), Tetracyclin (10 µg/ml; plasmid pRKbkt1) und Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (0.5 mM) gezüchtet.

Die Isolierung der Carotinoide erfolgte wie unter den allgemeinen Arbeitsvorschriften beschrieben.

Fig. 2 (A) zeigt das HPLC-Diagramm der Carotinoide, die aus E. coli-Zellen, enthaltend das Plasmid pACCAR16DcrtX zusammen mit dem Plasmid pRKbkt1, enthaltend das  $\beta$ -Carotin-Ketolase-Gen (bkt) extrahiert wurden.

Durch Einbau des Plasmid pRKbkt1 produzieren die transformierten E. coli-Zellen das Ketogruppentragenden Xanthophyll Canthaxanthin.

2.3 Einbau des Plasmids pRKbkt1 und des Carotinhydroxylase-Gens in  $\beta$ -Carotin-produzierende E. coli-Zellen, Kultivieren der transformierten Zellen und Isolierung der Xanthophylle Astaxanthin, Canthaxanthin, Adonixanthin, Zeaxanthin und  $\beta$ -Cryptoxanthin

45 Die Transformation der unter 1.1. beschriebenen,  $\beta$ -Carotin-produzierenden E. coli-Zellen, enthaltend das Plasmid pACCAR16DcrtX mit dem unter 2.1 beschriebenen Plasmid pRKbkt1, enthaltend das  $\beta$ -Carotin-Ketolase-Gen (bkt) und mit dem unter 1.3 beschriebenen Plasmid, enthaltend das Carotinhydroxylase-Gen, erfolgte in an sich bekannter Weise wie in J. Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989, beschrieben.

50 Die transformierten E. coli-Zellen wurden analog wie unter 1.3 beschrieben 48 h in LB Medium bei 28°C, allerdings unter Zugabe von Ampicillin (50 µg/ml; Plasmid enthaltend das Carotinhydroxylase-Gen), Chloramphenicol (30 µg/ml; Plasmid pACCAR16DcrtX), Tetracyclin (10 µg/ml; Plasmid pRKbkt1) und Isopropyl- $\beta$ -D-thio-galactopyranosid (0,5 mM) gezüchtet.

Die Isolierung der Carotinoide erfolgte wie unter den allgemeinen Arbeitsvorschriften beschrieben. Fig. 2 zeigt die HPLC-Diagramme der Carotinoide extrahiert aus

- 55 (A) E. coli-Zellen, enthaltend das Plasmid pACCAR16DcrtX nach 1.1 zusammen mit dem Plasmid pRKbkt1 und  
(B) E. coli-Zellen, enthaltend das Plasmid pACCAR16DcrtX zusammen mit dem Plasmid pRKbkt1 und dem Carotinhydroxylase-Gen nach 1.2.

60 Fig. 2 (C) zeigt Astaxanthin als Vergleichsstandard.  
In Fig. 2 bedeuten die Peak-Nummern

- 1 Astaxanthin  
2 Adonixanthin  
3 Zeaxanthin  
4 Canthaxanthin  
5  $\beta$ -Cryptoxanthin  
6  $\beta$ -Carotin

Wie man Fig. 2 entnehmen kann, produzieren die transformierten E. coli-Zellen durch Einbau des erfindungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gens zusammen mit dem Plasmid pRKbkt1, enthaltend das  $\beta$ -Carotin-Ketolase-Gen (bkt), die hy-

# DE 199 16 140 A 1

droxylierten und/oder Ketogruppen-tragenden Xanthophylle Astaxanthin, Canthaxanthin, Adonixanthin, Zeaxanthin und  $\beta$ -Cryptoxanthin, während ohne dem erfundungsgemäßen Carotinhydroxylase-Gen nur Canthaxanthin produziert wird.

In Enzymstudien an der  $\beta$ -Carotin-Ketolase aus *Haematococcus pluvialis* konnte gezeigt werden, daß das Enzym hauptsächlich  $\beta$ -Carotin in Canthaxanthin umwandelt, während Hydroxylgruppen-tragende Xanthophylle, wie Zeaxanthin und  $\beta$ -Cryptoxanthin kaum und nur bis Adonixanthin und nicht bis Astaxanthin umgesetzt werden (T. Lotan, J. Hirschberg, FEBS Lett. 364 (1995) 125–128; J. Breitenbach, N. Misawa, S. Kajiwara, G. Sandmann, FEMS Microbiol. Lett. 140 (1996) 241–246; P. D. Fraser, H. Shimada, N. Misawa, Eur. J. Biochem. 252 (1998) 229–236).

Die Tatsache, daß die in Beispiel 2.3 transformierten *E. coli*-Zellen in der Lage sind Astaxanthin zu produzieren, beweist, daß die erfundungsgemäße Carotinhydroxylase in der Lage ist, Canthaxanthin über Phoenicoxanthin (Adonirubin) in Astaxanthin umzuwandeln.

Die erfundungsgemäße Carotinhydroxylase ist dementsprechend in der Lage, die Umwandlung eines  $\beta$ -Ionon-Strukturelements in ein 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie die Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin,  $\beta$ -Carotin in  $\beta$ -Cryptoxanthin,  $\beta$ -Cryptoxanthin in Zeaxanthin, Echinon in 3'-Hydroxyechinon, 3-Hydroxyechinon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin),  $\alpha$ -Carotin in  $\alpha$ -Cryptoxanthin oder weiterer chemischer Verbindung mit bis zu 40 C-Atomen, die einen  $\beta$ -Ionon-Ring enthalten, in die entsprechenden 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Verbindungen oder die Umwandlung eines 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelements in ein 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement, wie die Umwandlung von Canthaxanthin in Astaxanthin, Canthaxanthin in Phoenicoxanthin (Adonirubin), Phoenicoxanthin (Adonirubin) in Astaxanthin, Echinon in 3-Hydroxyechinon, 3'-Hydroxyechinon in Adonixanthin (4-Ketozeaxanthin) oder weiterer chemischer Verbindung mit bis zu 40 C-Atomen, die einen 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Ring enthalten, in die entsprechenden 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Verbindungen zu katalysieren.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## DE 199 16 140 A 1

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; BASF Aktiengesellschaft

5 <120> Carotinhydroxylase und Verfahren zur Herstellung von  
Xantophylllderivaten

10 &lt;130&gt; OZ 0050/49896

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

15 &lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Vers. 2.0

20 &lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1607

&lt;212&gt; DNA

25 &lt;213&gt; Haematococcus pluvialis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

30 &lt;222&gt; (3)..(968)

&lt;400&gt; 1

35 ct aca ttt cac aag ccc gtg agc ggt gca agc gct ctg ccc cac atc 47  
Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile  
1 5 10 1540 ggc cca cct cct cat ctc cat cggt tca ttt gct gct acc acg atg ctg 95  
Gly Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu  
20 25 3045 tcg aag ctg cag tca atc agc gtc aag gcc cgc cgc gtt gaa cta gcc 143  
Ser Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala  
35 40 4550 cgc gac atc acg cgg ccc aaa gtc tgc ctg cat gct cag cgg tgc tcg 191  
Arg Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser  
50 55 6055 tta gtt cgg ctg cga gtg gca gca cca cag aca gag gag gcg ctg gga 239  
Leu Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly  
65 70 7560 acc gtg cag gct gcc ggc gcg ggc gat gag cac agc gcc gat gta gca 287  
Thr Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala  
80 85 90 95

65

## DE 199 16 140 A 1

ctc cag cag ctt gac cg	gct atc gca gag cgt cgt	gcc cg	gc a	aa	335
Leu Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys					
100	105	110			
5					
cg	gag cag ctg tca tac cag	gct gcc att gca gca tca att ggc		383	
Arg Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly					
115	120	125			10
10					
gtg tca ggc att gcc atc tt	cc acc tac ctg aga ttt gcc atg cac			431	
Val Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His					
130	135	140			15
15					
atg acc gtg ggc ggc gca gtg cca tgg ggt gaa gtg gct ggc act ctc				479	
Met Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu					
145	150	155			20
20					
ctc ttg gtg gtt ggt ggc gcg ctc ggc atg gag atg tat gcc cg	c t	at	tat	527	
Leu Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr					
160	165	170	175		25
25					
gca cac aaa gcc atc tgg cat gag tcg cct ctg ggc tgg ctg ctg cac				575	
Ala His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His					
180	185	190			30
30					
aag agc cac cac aca cct cgc act gga ccc ttt gaa gcc aac gac tt	g			623	
Lys Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu					
195	200	205			35
35					
ttt gca atc atc aat gga ctg ccc gcc atg ctc ctg tgt acc ttt ggc				671	
Phe Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly					
210	215	220			40
40					
ttc tgg ctg ccc aac gtc ctg ggg gcg gcc tgc ttt gga gcg ggg ctg				719	
Phe Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu					
225	230	235			45
45					
ggc atc acg cta tac ggc atg gca tat atg ttt gta cac gat ggc ctg				767	
Gly Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu					
240	245	250	255		50
50					
gtg cac agg cgc ttt ccc acc ggg ccc atc gct ggc ctg ccc tac atg				815	
Val His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met					
260	265	270			55
55					
aag cgc ctg aca gtg gcc cac cag cta cac cac agc ggc aag tac ggt				863	
Lys Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly					
275	280	285			60
60					
ggc gcg ccc tgg ggt atg ttc ttg ggt cca cag gag ctg cag cac att				911	
Gly Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile					
290	295	300			65

## DE 199 16 140 A 1

cca ggt gcg gcg gag gag gtg gag cga ctg gtc ctg gaa ctg gac tgg 959  
 Pro Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp  
 305 310 315

tcc aag cgg tagggtgcgg aaccaggcac gctggttca cacctcatgc 1008  
 Ser Lys Arg

320

ctgtgataag gtgtggctag agcgatgcgt gtgagacggg tatgtcacgg tcgactggc 1068

tgatggccaa tggcatcgcc catgtctggt catcacgggc tggttgcctg ggtgaaggtg 1128

atgcacatca tcatgtgcgg ttggagggc tggcacagtg tggctgaac tggagcagt 1188

gtccaggctg gcgttgaatc agtgagggtt tgtgattggc ggttgtgaag caatgactcc 1248

gcccatattc tatttgtggg agctgagatg atggcatgct tggatgtgc atggatcatg 1308

gtagtgcagc aaactatatt cacctaggc tgttggtagg atcaggtgag gccttgcaca 1368

ttgcatgatg tactcgcat ggtgtgtgg tgagaggatg gatgtggatg gatgtgtatt 1428

ctcagacgta gaccttgact ggaggcttga tcgagagagt gggccgtatt ctttgagagg 1488

ggaggctcgt gccagaaatg gtgagtggat gactgtgacg ctgtacattg caggcaggtg 1548

agatgcactg tctcgattgt aaaatacatt cagatgcaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1608

<210> 2

<211> 322

<212> PRT

<213> Haematococcus pluvialis

<400> 2

Thr Phe His Lys Pro Val Ser Gly Ala Ser Ala Leu Pro His Ile Gly  
 1 5 10 15

Pro Pro Pro His Leu His Arg Ser Phe Ala Ala Thr Thr Met Leu Ser  
 20 25 30

Lys Leu Gln Ser Ile Ser Val Lys Ala Arg Arg Val Glu Leu Ala Arg  
 35 40 45

Asp Ile Thr Arg Pro Lys Val Cys Leu His Ala Gln Arg Cys Ser Leu  
 50 55 60

Val Arg Leu Arg Val Ala Ala Pro Gln Thr Glu Glu Ala Leu Gly Thr  
 65 70 75 80

65

## DE 199 16 140 A 1

Val Gln Ala Ala Gly Ala Gly Asp Glu His Ser Ala Asp Val Ala Leu				
85	90	95		5
Gln Gln Leu Asp Arg Ala Ile Ala Glu Arg Arg Ala Arg Arg Lys Arg				
100	105	110		
Glu Gln Leu Ser Tyr Gln Ala Ala Ala Ile Ala Ala Ser Ile Gly Val				10
115	120	125		
Ser Gly Ile Ala Ile Phe Ala Thr Tyr Leu Arg Phe Ala Met His Met				
130	135	140		15
Thr Val Gly Gly Ala Val Pro Trp Gly Glu Val Ala Gly Thr Leu Leu				
145	150	155	160	20
Leu Val Val Gly Gly Ala Leu Gly Met Glu Met Tyr Ala Arg Tyr Ala				
165	170	175		
His Lys Ala Ile Trp His Glu Ser Pro Leu Gly Trp Leu Leu His Lys				
180	185	190		25
Ser His His Thr Pro Arg Thr Gly Pro Phe Glu Ala Asn Asp Leu Phe				
195	200	205		30
Ala Ile Ile Asn Gly Leu Pro Ala Met Leu Leu Cys Thr Phe Gly Phe				
210	215	220		35
Trp Leu Pro Asn Val Leu Gly Ala Ala Cys Phe Gly Ala Gly Leu Gly				
225	230	235	240	
Ile Thr Leu Tyr Gly Met Ala Tyr Met Phe Val His Asp Gly Leu Val				
245	250	255		40
His Arg Arg Phe Pro Thr Gly Pro Ile Ala Gly Leu Pro Tyr Met Lys				
260	265	270		45
Arg Leu Thr Val Ala His Gln Leu His His Ser Gly Lys Tyr Gly Gly				
275	280	285		50
Ala Pro Trp Gly Met Phe Leu Gly Pro Gln Glu Leu Gln His Ile Pro				
290	295	300		55
Gly Ala Ala Glu Glu Val Glu Arg Leu Val Leu Glu Leu Asp Trp Ser				
305	310	315	320	
Lys Arg				60

## Patentansprüche

65

1. Protein, das eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von β-Carotin in Zeaxanthin oder Canthaxanthin in Astaxanthin aufweist, enthaltend die Aminosäuresequenz SEQ ID NO. 2 oder eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Aminosäuren abgeleitete Sequenz, die eine Homologie von mindestens 50%

# DE 199 16 140 A 1

- auf Anxinosäureebene mit der Sequenz SEQ ID NO.2 aufweist.
2. Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Zeaxanthin und eine enzymatische Aktivität zur Umwandlung von Canthaxanthin in Astaxanthin aufweist.
5. Nukleinsäure, codierend ein Protein gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2.
4. Nukleinsäure nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus der in SEQ ID NO. 1 dargestellten Sequenz besteht.
10. Nukleinsäurekonstrukt, enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder 4, die mit einem oder mehreren Regulationssignalen zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft ist.
6. Nukleinsäurekonstrukt nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß man die Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder 4 in einen Vektor insertiert, der für die Expression des Gens in einem prokaryontischen oder eukaryontischen Organismus geeignet ist.
15. Genetisch veränderter Organismus, wobei die genetische Veränderung die Genexpression einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder 4 gegenüber einem Wildtyp  
für den Fall, daß der Ausgangsorganismus eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder 4 enthält, erhöht oder  
für den Fall, daß der Ausgangsorganismus eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder 4 nicht enthält, verursacht.
8. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der genetisch veränderte Organismus gegenüber dem Wildtyp einen veränderten Carotinoid-Stoffwechsel aufweist.
9. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als Organismus  
20. einen eukaryontischen Organismus verwendet.
10. Genetisch veränderter Organismus nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß man als eukaryontischen Organismus eine Pflanze verwendet.
11. Verfahren zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen gemäß einem der Ansprüche 7 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 3 oder 4 oder ein Nukleinsäurekonstrukt gemäß  
25. Anspruch 5 oder 6 in das Genom des Ausgangsorganismus einführt.
12. Verwendung der Nukleinsäure nach Anspruch 3 oder 4 zur Herstellung von genetisch veränderten Organismen.
13. Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllderivaten, dadurch gekennzeichnet, daß man ein  $\beta$ -Ionon-Struktur-  
element in ein 3-Hydroxy- $\beta$ -Ionon-Strukturelement und/oder ein 4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement in ein 3-Hydroxy-4-Keto- $\beta$ -Ionon-Strukturelement in Gegenwart eines Proteins gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 überführt.
30. 14. Verfahren zur Herstellung von Xanthophyllderivaten nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Organismus gemäß einem der Ansprüche 7 bis 10 kultiviert, den Organismus erntet und die Xanthophyll-  
35. Derivate anschließend aus dem Organismus isoliert.
15. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2 zur Herstellung von Xanthophyllderivaten.
16. Verwendung der Nukleinsäure nach Anspruch 3 oder 4 zur Herstellung von Xanthophyllderivaten.

---

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

---

40

45

50

55

60

65

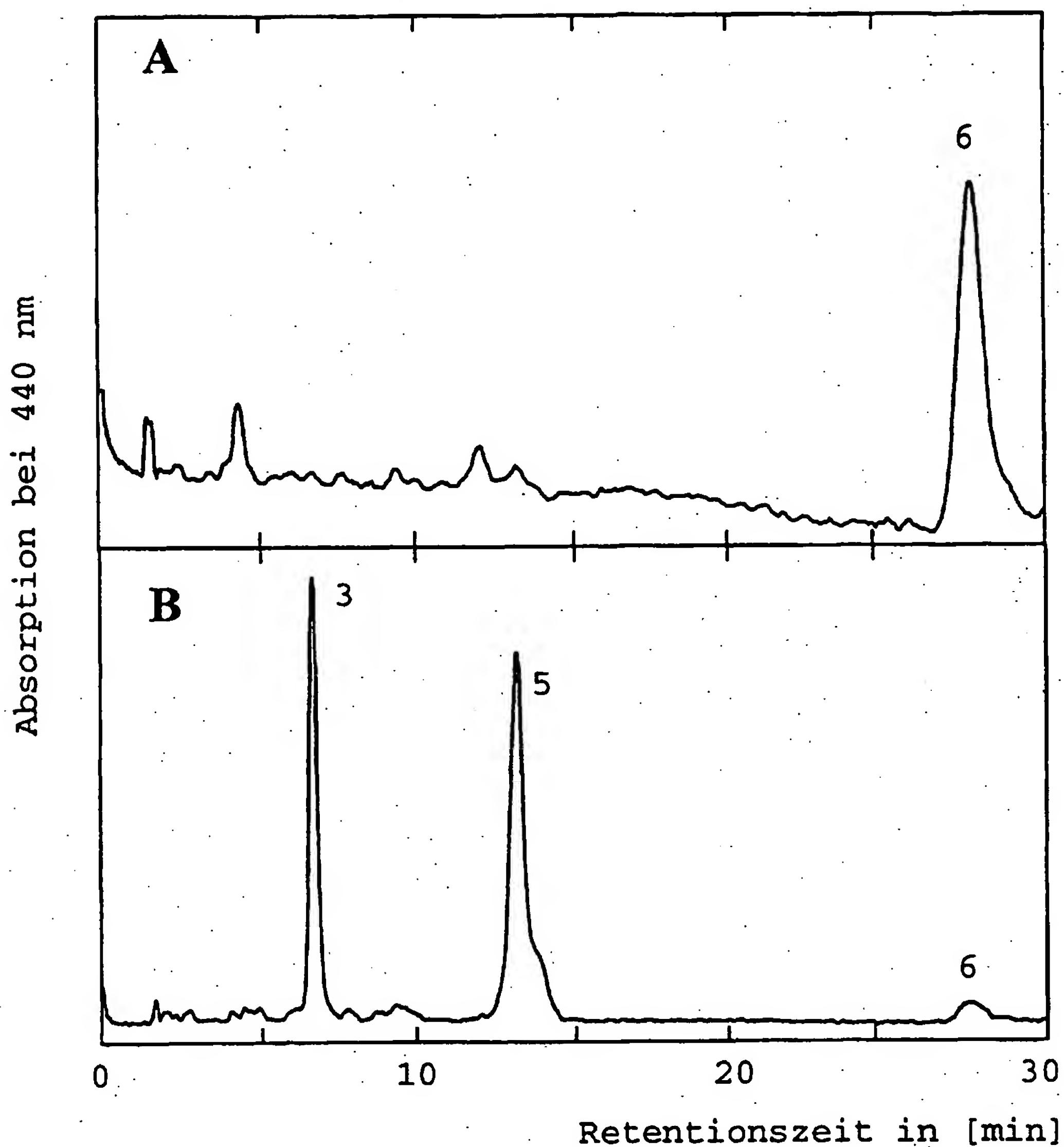


Fig. 1

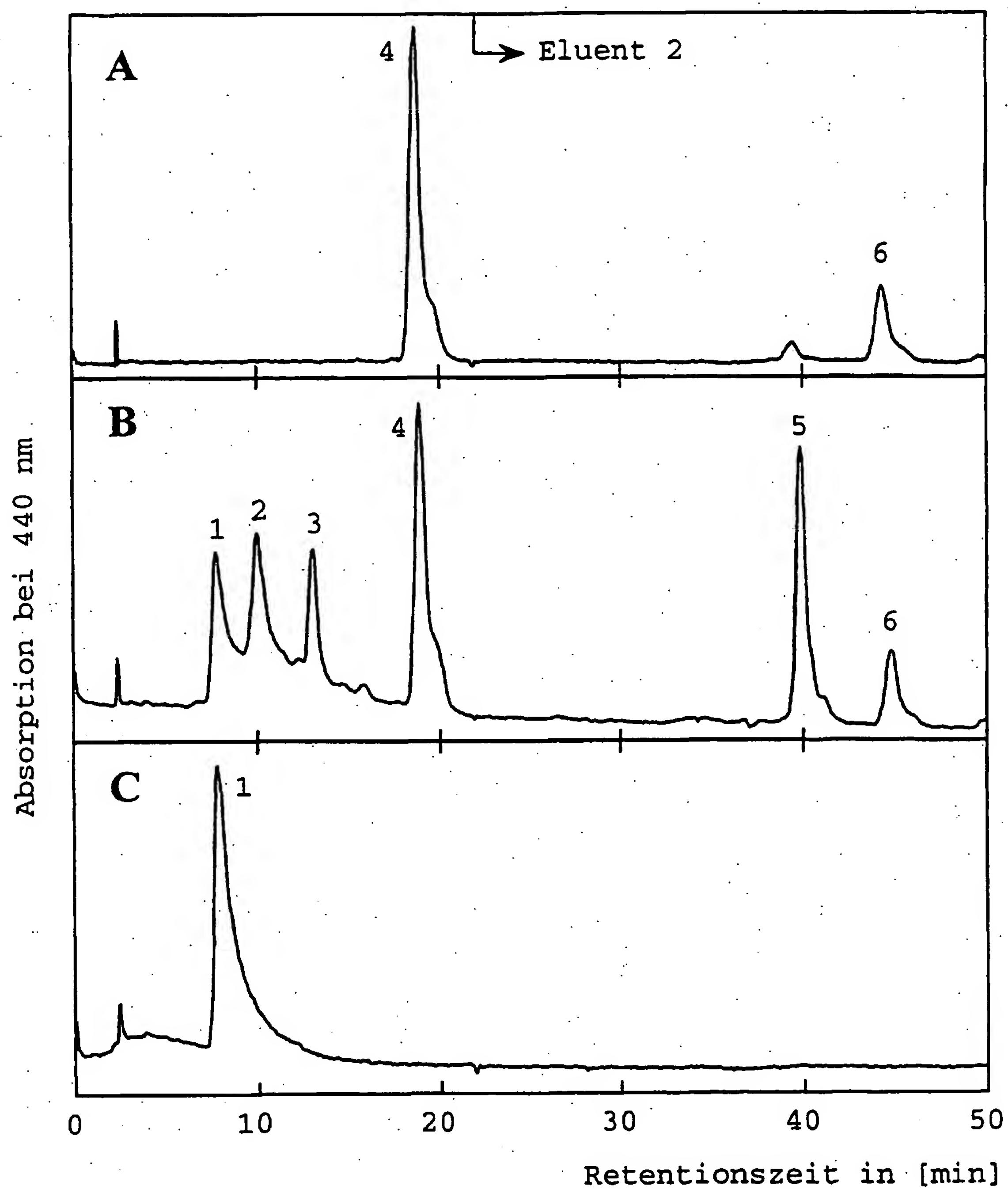


Fig. 2